SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 7546:2009

Deteksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada ikan laut dengan metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi i
Prakata ii
1 Ruang lingkup 1
2 Istilah dan definisi 1
3 Prinsip umum 2
4 Peralatan 2
5 Bahan 2
6 Prosedur 3
7 Pembacaan hasil 5
8 Keamanan dan keselamatan kerja 5
Lampiran A (normatif) Pembuatan media 6
Bibliografi 7

Tabel 1 - Komposisi pereaksi untuk first PCR (RT- PCR reaction) 3
Tabel 2 - Komposisi pereaksi untuk *nested* PCR 4
Tabel 3 - Pengaturan suhu dan siklus *thermocycler* reaksi *first* PCR 4
Tabel 4 - Pengaturan suhu dan siklus *thermocycler* reaksi *nested* PCR 4

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *Nervous Necrosis Virus* (VNN) pada ikan laut dengan metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas dalam rapat-rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 25 Agustus 2008 di Bogor dengan memperhatikan:

1. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 2 April 2009 sampai dengan 2 Juni 2009 dengan hasil akhir RASNI.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

Deteksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada ikan laut dengan metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Nervous Necrosis Virus* (VNN) pada ikan laut dengan metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

2 Istilah dan definisi

2.1
amplifikasi
reaksi pelipatgandaan cDNA target secara *in vitro* sehingga dapat dideteksi dengan elektroforesis

2.2
annealing
penempelan *oligonucleutida* primer pada DNA untai tunggal

2.3
denaturasi
pemisahan DNA target dari untai ganda menjadi untai tunggal

2.4
elektroforesis
proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan pada berat molekul

2.5
extention
pemanjangan primer dengan bantuan enzim *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal baru

2.6
inkubasi
pengkondisian lingkungan untuk tumbuh dan berkembangbiak sehingga virus dapat tumbuh dan menunjukkan karakteristik sesuai dengan yang dikehendaki

2.7
primer
suatu *oligonukleotida* (*nukleotida* dengan panjang rantai asam nukleat antara 20 - 30) digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.8
***Reverse Trasncriptase* (RT)**
reaksi balik RNA menjadi cDNA menggunakan enzim *reverse transcripstase*

2.9
RNA
Ribonucleid Acid, materi genetik untai tunggal yang dimiliki oleh virus hasil transkripsi dari DNA

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

2.10
VNN
virus golongan *betanodavirus* yang menyerang sistem syaraf dan retina mata ikan laut dikenal dengan nama *Viral Encephalopathy and Retinophaty* (VER)

3 Prinsip umum

Contoh organ berupa otak dan mata (untuk ikan ukuran besar) atau seluruh bagian kepala (untuk larva) dipreparasi, kemudian secara berturut-turut dilakukan ekstraksi materi genetik (RNA), reaksi RT-PCR, elektroforesis, dokumentasi dan pembacaan hasil.

4 Peralatan

a) *glassware*;
b) hotplate magnetic stirer/microwave;
c) kamera/alat dokumentasi;
d) mesin *portable/table top micro-centrifuge*;
e) mikro pipet 1000 µl, 200 µl, 100 µl,10 µl;
f) pellet pestle;
g) perangkat elektroforesis;
h) *power suplay* untuk elektroforesis;
i) stirer bar;
j) *thermal cycler* (mesin PCR);
k) timbangan analitik;
l) *uv trans-illuminator*;
m) *vortex mixer*.

5 Bahan

a) *agarose*;
b) alkohol *absolut*;
c) *buffer* 1 x TAE atau 1 x TBE;
d) *chloroform* ($CHCl_3$);
e) ddH_2O;
f) DNA *ladder/marker* (berat molekul menyesuaikan dengan produk);
g) *isopropanol*;
h) IQzyme;
i) kontrol positif;
j) kontrol negatif;
k) larutan *ethidium bromide*;
l) *loading dye*;
m) mikrotube 0,2 ml dan 1,5 ml;
n) mikrotip 1000 µl, 200 µl,10 µl;
o) *premix* RT-PCR;
p) *premix nested* PCR;
q) RNA *extraction solution;*
r) RT-*enzym mix*.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

6 Prosedur

6.1 Ekstraksi RNA

a) Masukkan contoh 20 mg ke dalam mikrotube berukuran 1,5 ml yang berisi 500 µl RNA *extraction solution*.
b) Gerus contoh dengan *pellet pestle* steril dan inkubasi dalam suhu 25 °C - 30 °C selama 5 menit.
c) Tambahkan 100 µl *chloroform* ($CHCl_3$) ke dalam tabung.
d) *Vortex* selama 20 detik.
e) Inkubasi contoh dalam suhu 25 °C - 30 °C selama 2 menit - 3 menit.
f) Sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm (r = 7 cm) selama 15 menit.
g) Pindahkan fase cair pada bagian atas sebanyak 200 µl ke dalam tabung reaksi ukuran 1,5 ml yang berisi 200 µl *isopropanol*.
h) Campur menggunakan *vortex* selama 20 detik.
i) Sentrifugasi contoh pada kecepatan 12000 rpm (r = 7 cm) selama 10 menit kemudian buang cairan.
j) Cuci dengan menambahkan 500 µl alkohol 75 %.
k) Sentrifugasi pada kecepatan 9000 rpm (r = 7 cm) selama 5 menit.
l) Buang alkohol *absolut* dan keringanginkan.
m) Larutkan padatan dengan 200 µl ddH_2O.
n) Hasil ekstraksi RNA harus segera diproses lebih lanjut.

6.2 Amplifikasi

6.2.1 Komposisi pereaksi RT-PCR

a) Dalam amplifikasi diperlukan formulasi pereaksi *first* PCR (RT-PCR *reaction*) dan *nested* PCR seperti pada Tabel 1 dan Tabel 2.
b) Siapkan formulasi reaksi *first* PCR dan *nested* PCR untuk sejumlah reaksi yang terdiri dari 1 kontrol positif berat (2000 copy) dan/atau 1 kontrol positif sedang (200 copy) dan/ atau 1 kontrol positif ringan (20 copy), 1 kontrol negatif dan sejumlah sampel.
c) Masukkan 8 µl pereaksi f*irst* PCR ke dalam mikrotube ukuran 0,2 ml dan tambahkan 2 µl sampel. Proses ini juga dilakukan pada yang berisi kontrol negatif dan kontrol positif. Kemudian dilakukan amplifikasi dengan siklus seperti pada Tabel 3.
d) Setelah reaksi *first* PCR selesai, ke dalam setiap mikrotube ditambahkan 15 µl pereaksi *nested* PCR dan dilanjutkan dengan amplikasi dengan siklus seperti pada Tabel 4. Setelah reaksi PCR selesai seluruh sampel dilakukan elektroforesis atau disimpan dalam *refrigerator*.

CATATAN: Seluruh proses persiapan amplifikasi dilakukan dalam keadaan dingin.

Tabel 1 - Komposisi pereaksi untuk first PCR (RT- PCR reaction)

No	Pereaksi	Jumlah atau volume pereaksi
1	*Premix* RT-PCR	7,0 µl
2	*IQzyme* 2 unit/µl	0,5 µl
3	RT-*enzyme* mix	0,5 µl

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Sedangkan untuk formulasi pereaksi *nested* PCR terdiri:

Tabel 2 - Komposisi pereaksi untuk *nested* PCR

No	Pereaksi	Jumlah atau volume pereaksi
1	*Premix nested* PCR	14 µl
2	*IQzyme* 2 unit/µl	1,0 µl

6.2.2 Pengaturan suhu dan siklus *thermocycler*

Tabel 3 - Pengaturan suhu dan siklus *thermocycler* reaksi *first* PCR

No	Suhu	Lama	Jumlah siklus
1	42 °C	30 menit	1 siklus
2	94 °C	2 menit	
3	94 °C	30 detik	15 siklus
4	62 °C	30 detik	
5	72 °C	30 detik	
6	72 °C	30 detik	1 siklus
7	20 °C	7 menit	

Tabel 4 - Pengaturan suhu dan siklus *thermocycler* reaksi *nested* PCR

No	Suhu	Lama	Jumlah siklus
1	94 °C	20 detik	30 siklus
2	62 °C	20 detik	
3	72 °C	30 detik	
4	72 °C	30 detik	1 siklus
5	20 °C	7 menit	

6.3 Elektroforesis

a) Siapkan parafilm di depan unit elektroforesis.
b) Siapkan 2 µl *loading dye* sesuai jumlah sampel.
c) Lakukan preparasi DNA marker dengan prosedur sesuai dengan aturan dari produk yang akan dipakai. Masukkan 4 µl *marker* ke dalam sumur gel *agarose*.
d) Ambil 10 µl hasil PCR (*amplicon*) dan campurkan dengan masing-masing *loading dye*.
e) Masukkan 10 µl campuran tersebut ke dalam sumur-sumur berikutnya.
f) Alirkan listrik 100 V hingga indikator warna *bromphenol blue* bergerak 3/4 bagian dari panjang gel, hindari jangan sampai *loading dye* keluar dari gel.

CATATAN: Apabila menggunakan marker komersil menggunakan petunjuk di kit komersil

6.4 Pewarnaan gel

a) Masukkan gel *agarose* ke larutan pewarnaan (0,05 % *ethidium bromide*) dalam wadah plastik, sampai terendam seluruhnya.
b) Biarkan pada suhu ruang selama 10 menit kemudian angkat.
c) Bilas gel *agarose* dalam akuades selama 10 menit.
d) Letakkan *agarose* gel pada UV *transiluminator* kemudian baca hasil akhirnya.

© BSN 2009

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

7 Pembacaan hasil

a) Analisa berat molekul *amplicon* dilakukan dengan membandingkan band pada marker dan band yang terbentuk pada *amplicon*.
b) Pembacaan hasil dilakukan sebagai berikut:
 - sampel negatif apabila terbentuk band pada posisi 665 bp;
 - sampel positif ringan apabila terbentuk band pada posisi 289 bp;
 - sampel positif sedang apabila terbentuk band pada posisi 289 bp dan 479 bp;
 - sampel positif berat apabila terbentuk band pada posisi 289 bp, 479 bp dan 1160 bp.

8 Keamanan dan keselamatan kerja

a) Gunakan jas laboratorium, sarung tangan dan penutup mulut. Dan jika berambut panjang harus diikat dengan rapi selama bekerja di laboratorium.
b) Dilarang merokok, makan (termasuk permen karet) atau minum di ruangan laboratorium.
c) Jangan memasukkan pensil, pulpen, kertas label dan barang lainnya kedalam mulut saat bekerja di laboratorium. Benda-benda tersebut juga tidak boleh dibawa keluar ruangan laboratorium untuk menghindari kontaminasi.
d) Dilarang memipet menggunakan mulut,dan hindarkan aerosol saat memindahkan cairan.
e) Bersihkan meja kerja dengan desinfektan sebelum dan sesudah bekerja.
f) Tempatkan dalam wadah khusus gel dan semua peralatan sekali pakai seperti tissue, sarung tangan dan dan material padat lainnya yang mengandung *ethidium bromide*, untuk kemudian diserahkan kepada pihak ketiga secara periodik untuk dimusnahkan.
g) Tempatkan *ethidium bromide* yang kandungannya lebih besar dalam wadah. Serahkan wadah tersebut kepada pihak ketiga secara periodik untuk dimusnahkan.
h) Jika terjadi tumpahan ethidium bromide, jika sedikit serap dengan tissue, jika banyak serap dengan *attapulgit absorbsion* kemudian gosok dengan tissue handuk yang dibasahi dengan campuran 4,2 gram *sodium nitrite* dalam 300 ml air dan tambahkan 20 ml *hyphosphorous acid* (50 %). Aduk rata agar tercampur (pH 1,8). Kemudian keringkan.
i) Buanglah material tajam (jarum, *scalpel*, slide pecah, tip, dll) kedalam wadah pembuangan khusus material tajam. Serahkan wadah tersebut kepada pihak ketiga secara periodik untuk dimusnahkan.
j) Cuci tangan dengan air dan sabun sebelum dan setelah selesai bekerja.
k) Bekerjalah dengan berhati-hati dan tidak terburu-buru.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan media

A.1 Penyiapan *ethidium bromide*

Ethidium Bromide (EtBr) disiapkan dalam larutan *stock* 10 mg/ml dalam botol gelap

CATATAN: *Ethidium bromide* merupakan bahan mutagen yang sangat kuat dan dapat menyebabkan kanker, maka jika sedang bekerja dengan menggunakan *ethidium bromide* pakailah selalu sarung tangan.

A.2 Pembuatan akohol 75 %

a) Tuangkan alkohol absolut sebanyak 75 ml ke dalam gelas ukur.
b) Tambahkan akuades sampai dengan volume 100 ml.

A.3 Persiapan *agarose*

a) Buat agarose 1,5 % - 2 % (w/v) dalam larutan 1 x TAE atau 1 x TBE ke dalam botol gelas.
b) Panaskan pada suhu 100 °C - 150 °C selama 10 menit dalam *hotplate magnetic stirrer/microwave* (sampai larutan bening).
c) Angkat dari pemanas, buka tutup botol, kemudian diamkan hingga suhu 60 °C. Apabila menggunakan *hotplate stirer* ambil *stirer bar* terlebih dahulu.
d) Kemudian tuangkan larutan *agarose* ke dalam cetakan *agarose* yang telah dipasangi sisir (*comb*).
e) Hindari terjadinya gelembung udara.
f) Buang gelembung udara yang terbentuk dengan mikrotip.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

Bibliografi

IQ 2000. 2003. *Detection and prevention system for Nodaviruses of Marine Fishes, Sea Farming Intellegence*, Taiwan

Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal, *Fourth Edition* 2003, *Office des Internationale Epizootics* (OIE) -2003.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2009

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id

© BSN 2009